

## PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 05-184383

(43)Date of publication of application : 27.07.1993

---

(51)Int.Cl.

C12P 21/08

// C12N 5/18

C12N 15/06

G01N 33/53

G01N 33/531

G01N 33/574

G01N 33/577

(C12P 21/08

C12R 1:91 )

---

(21)Application number : 03-240139 (71)Applicant : DAINABOTSUTO KK

(22)Date of filing : 17.06.1991 (72)Inventor : KURATA KUNIO  
KUMAGAI YASUYUKI  
FUJITA AKITATSU  
HAYAKAWA  
SUSUMU

---

(30)Priority

Priority number 02158817 Priority date 19.06.1990 Priority JP  
: : country :

---

(54) BISPECIFIC ANTIBODY

**(57)Abstract:**

**PURPOSE:** To obtain a monoclonal antibody having bispecific property, capable of carrying out label by a labeling agent or cytotoxin activating agent without chemically treating an antibody and capable of freely changing the labeling agent, etc.

**CONSTITUTION:** The objective bispecific antibody being an antibody having specificity to two different antigens, in which either one of these antigens is biotin or a biotin derivative and the other is antigen different from the first antigen is obtained from a fused cell obtain by cell fusion of an anti-biotin monoclonal antibody producing cell having specificity to biotin or the biotin derivative and monoclonal antibody producing cell having specificity to antigen other than biotin or a biotin derivative.

---

**LEGAL STATUS**

[Date of request for examination] 10.04.1997

[Date of sending the examiner's decision of rejection] 30.11.1999

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

**\* NOTICES \***

JPO and NCIP1 are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

- 1.This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
- 2.\*\*\*\* shows the word which can not be translated.
- 3.In the drawings, any words are not translated.

---

**CLAIMS**

---

[Claim(s)]

[Claim 1] The bispecific antibody characterized by being the antibody which has singularity to two different antigens, for one side of this antigen being a biotin or a biotin derivative, and another side being this first antigen and a different antigen.

[Claim 2] The bispecific antibody according to claim 1 characterized by being produced by the syncytium of the antibiotin monoclonal antibody production cell which has singularity to a biotin or a biotin derivative, and the monoclonal antibody production cell which has singularity to antigens other than a biotin or a biotin derivative.

[Claim 3] The bispecific antibody according to claim 1 or 2 this first antigen and whose different antigen are protein, polysaccharide, nucleic acids, and these connectives.

[Claim 4] The bispecific antibody according to claim 1 or 2 this first antigen and whose different antigen are a human serum albumin, a carcinoembryonic antigen, elastase 1, IgE, an insulin, a squamous-cell-carcinoma related antigen (SCC), and TSH.

[Claim 5] syncytium TBHF1H 50 [(trust number) Fermentation Research Institute mycoparasite No. 11532] TBHF2H -- 6 [(trust number) the Fermentation Research Institute mycoparasite No. 11531] or TBCF1H -- the bispecific antibody according to claim 1 or 2 which 3 [(trust number) the Fermentation Research Institute mycoparasite No. 12287] secretes.

[Claim 6] The bispecific antibody according to claim 1 to 4 whose biotin derivative is a biotin-ized enzyme or the biotin-ized fluorescent material.

---

[Translation done.]

**\* NOTICES \***

JPO and NCIP I are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

- 1.This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
- 2.\*\*\*\* shows the word which can not be translated.
- 3.In the drawings, any words are not translated.

---

**DETAILED DESCRIPTION**

---

[Detailed Description of the Invention]

[0001]

[Industrial Application] This invention relates to the bispecific antibody which has singularity to a different antigen from a biotin or a biotin derivative and this biotin, or a biotin derivative in more detail about a bispecific antibody.

[0002]

[Description of the Prior Art] As an approach of measuring the minute amount matter in body fluid, such as blood and urine, to high sensitivity, immunoassay is widely used in the medical field, especially the field of a diagnosis. Since it has advantages, like it is possible that the singularity is high and to supply a single antibody to a large quantity comparatively simply and, especially the monoclonal antibody by the hybridoma method since Milstein and others announced the process of the monoclonal antibody by the cell fusion of the myeloma cell of a mouse and the antibody forming cell in a spleen in 1975 attracted attention dramatically, and is studied and used briskly.

[0003] In using this monoclonal antibody as a marker antibody, chemical processing is performed to this antibody molecule, it is combined, and it uses radioisotope, the enzyme, or the fluorescent material for it. However, if such chemical preparation is performed to an antibody molecule, breakage is done to an antibody molecule, and the specific activity of an antibody falls, and the stability of an antibody is affected, and these cause [ of the assay stability of a system or sensibility ] lowering.

[0004] On the other hand, two different antigen recognition nature is given into an antibody molecule using the singularity of a monoclonal antibody being high, the method of expanding the utilization range of an antibody is studied, and the report is already made about the antibody which is that one binding affinity of such a bispecific antibody recognizes an enzyme to be directly. However, since this antibody was what recognizes a direct enzyme, when using it in the field of an immunological diagnosis as a labelled antibody, it was not able to hang down versatility to the class of enzyme, i.e., the class of indicator agent,, either.

[0005] Moreover, although the approach of making combine an antitumor agent with an antibody and acting to a tumor site as Dili Bar of the drugs selectively was studied in the medicinal field, since qualification of the both sides of an antibody which recognize the compound which is an antitumor agent, and a tumor site also in this case was needed, it was difficult [ it ] to have an adverse effect on an antitumor agent compound or an antibody, and to make various combination simply.

[0006]

[Problem(s) to be Solved by the Invention] In view of the above thing, it could apply to the wide range indicator agent or the cytotoxin activator, and offer of the antibody excellent in stability was demanded.

[0007]

[Objects of the Invention] The indicator by the indicator agent or the cytotoxin activator is possible for this invention, without processing an antibody chemically, and further, even if it changes the indicator agent in system of measurement or changes a cytotoxin activator in cancer treatment, it offers the monoclonal antibody which has large applicable duplex singularity.

[0008]

[Means for Solving the Problem] The bispecific antibody concerning this invention is a monoclonal antibody which has singularity in both a certain kind of antigen, a biotin, or a biotin derivative. That is, by combining this bispecific antibody, the biotin-ized enzyme and a fluorescent material, or a cytotoxin active substance, it makes it possible to use as a marker or a targetting agent, without processing an antibody molecule chemically, and further, it is used for the increment in the stability of an antibody, and antigen system of measurement which is different in a biotin-ized enzyme etc., or also makes it possible to act as Dili Bar of various kinds of anticancer agents using the biotin-ized anticancer agent.

[0009] The bispecific antibody concerning this invention can be produced according to the following procedure.

[0010] First, the monoclonal antibody production hybridoma to the antigen which should be measured, and the monoclonal antibody production hybridoma to a biotin are produced according to the usual approach, respectively. Next, the respectively different enzyme of the nucleic-acid biosynthesis salvage pathway in these hybridomas is made to suffer a loss. That is, the monoclonal antibody production hybridoma to an antigen is hypoxanthine. Guanine Phospho ribosyl A transferase (HGPRT) deficit cell and the monoclonal antibody production cell to a biotin are thymidine. It considers as a kinase (TK) deficit cell. After uniting these two different enzyme defect cells by the polyethylene-glycol method, only syncytium is chosen using a HAT medium (culture medium which added hypoxanthine ( $10^{-4}M$ ), aminopterin ( $4 \times 10^{-7}M$ ), and thymidine ( $1.6 \times 10^{-5}M$ ) to the normal culture medium). Thus, obtained hybrid The cell strain which is producing the antibody which recognizes an antigen and a biotin simultaneously by cloning is chosen from a hybridoma, the obtained monoclonal antibody production stock is prescribed for the patient into the mouse abdominal cavity, antibody content ascites is produced, and the target antibody is obtained from this ascites. This antibody is a bispecific antibody with the binding affinity to an antigen, and the binding affinity to a biotin, and produces the system of measurement of an antigen, using this antibody as a marker. Moreover, it can also use as a targetting agent for carrying the compound which has the cytotoxin activity of HE, such as a tumor site, for this antibody. The above-mentioned monoclonal antibody production stock is a hybrid which it \*\*\*\*s to the Fermentation Research Institute, the Agency of Industrial Science and Technology, and is the Fermentation Research Institute mycoparasite No. (TBHF2H6) 11531 or the Fermentation Research Institute mycoparasite No. (TBHF1H50) 11532. The antibody which a hybridoma produces is a bispecific antibody which has singularity to a biotin and a human serum albumin, and can measure a human serum albumin by EIA by using

biotin-HRPO as an indicator agent using it.

[0011] Furthermore, the antibody which the hybrid hybridoma which is the Fermentation Research Institute mycoparasite No. (TBCF1H3) 12287 produces is a bispecific antibody which has singularity to a biotin and a carcinoembryonic antigen (CEA).

[0012] As a hybridoma which produces the monoclonal antibody to a different antigen (the second antigen) from this biotin or a biotin derivative Monoclonal antibody production hybridoma HSAF6H1C11 to a human serum albumin, HSAF6H33C11, Monoclonal antibody production hybridoma IGEF3H22 to monoclonal antibody production hybridoma ELSF13H4 and IgE to monoclonal antibody production hybridoma CEAF22H5 and CEA3519 to a carcinoembryonic antigen, and elastase 1, Monoclonal antibody production hybridoma INSF9H2 to an insulin, monoclonal antibody production hybridoma SCCF1H3 to the squamous-cell-carcinoma related antigen SCC, monoclonal antibody production hybridoma TSHF8H4 to TSH, etc. Although it can mention, if it seems that the above processings are carried out and a bispecific antibody can be manufactured as a monoclonal antibody production hybridoma to this second antigen, it can use without being limited especially.

[0013] In this case, as the second antigen which can be set, protein, a polypeptide, polysaccharide, nucleic acids, these connectives, etc. can be mentioned. Phosphorus protein, a lipoprotein, a glycoprotein, mucoprotein, bacteria, a virus, a tumor cell, rickettsias, or those surface antigens are mentioned to the inside of such a thing.

[0014] As protein and a polypeptide, tissue hormones, such as plasma protein, such as hormone, such as somatotropin, prolactin, an insulin, LH-RH, and gonadotropin, thyroxine binding globulin, alpha 1-antitrypsin, an alpha1-acidity glycoprotein, alpha 2-macroglobulin, and albumin, immunoglobulins or those fragments, a complement factor, a blood coagulation factor, secretin, and gastrin, are mentioned among such antigens.

[0015] In addition, what was known as cancer-associated antigens, for example, CEA, AFP, and SCC, Span-1, CA 19-9, CA125, 72-B3 antigen (TAG-72), a T antigen, etc. can be raised.

[0016] Moreover, the receptor of cell surface etc. is raised.

[0017] As the second antigen, various viruses and the production antigens of those, such as the various antigens which exist in a gram positive and a gram negative, a rickettsia, a mycoplasma or a hepatitis virus, an oncogenic virus, and an AIDS cause virus, are mentioned further again. Moreover, various kinds of drugs and drugs including drugs, such as antibiotics, such as various alkaloid, various steroids, penicillins and cephalosporins antibiotics, gentamycin, a kanamycin, and an erythromycin, a barbituric acid system drug, a catecholamine, and ephedrine, chlorpromazine, azepine, vitamins, and prostagladins are mentioned to the inside of these antigens. As long as it attains and deals in the object of this invention, these antigens can be chosen without limiting, and although known with the reference of the field concerned etc., they can be chosen from inside.

[0018] Thus, the obtained bispecific antibody can be used for immunological system of measurement, such as a sandwich technique which measures the antigen in body fluid, such as blood, and a staining method which measures the antigen under organization.

[0019] Can biotin-ize the compound which has cytotoxin activity, such as an anticancer agent, and a lysine and diphtheria toxin, further again, the bispecific antibody which recognizes a biotin and cancer-associated antigens especially is made to be able to

react with the biotin-ized cytotoxin activity compound, and antibody-drug conjugate can be formed. In this way, the obtained antibody-drug conjugate makes possible Dili Bar of the specific part which the bispecific antibody recognizes, for example, the drug to a tumor cell. In this way, if the obtained bispecific antibody is used, it will become possible to merely carry various drugs using a kind of antibody.

[0020] Measurement of the antigen by the sandwich technique can be performed as follows.

[0021] After making specimens, such as a blood serum and urine, react to the solid phase-ized antibody which was made to combine with insoluble support the antibody to the antigen which should be measured, and was obtained, washing clearance of the unreacted liquid is carried out. Next, the bispecific antibody solution which has binding affinity to a measurement antigen and a biotin is made to react. After washing solid phase furthermore, it reacts to this by mixing the biotin solution which combined the enzyme. This reaction mixes the bispecific antibody and the biotin-ized enzyme beforehand, and may make this mixed solution react with the solid phase after making a specimen react. This biotin-ized enzyme and the solid phase which reacted are washed, a substrate solution is added, and an enzyme reaction is made to perform. It can ask for the antigen concentration which should measure the absorbance of a reaction solution and should be measured from the standard curve which used the standard antigen instead of the specimen and was created, after stopping an enzyme reaction.

[0022] As for the bispecific antibody of this invention, one antigen recognition site recognizes a biotin, and since it is combinable with protein, or a nucleic acid and other various chemicals, a biotin can use various compounds, such as a fluorescent material, without being limited to an enzyme as an indicator agent, and also it can use various drugs, such as an antitumor agent. Furthermore, a biotin can also raise the sensibility of system of measurement by using a system with avidin.

[0023]

[Example] Hereafter, this invention is explained based on an example.

[0024] It is FUIROINDO about production HSA(Miles Inc.)50microg of an example 1 anti-human serum albumin (HSA) antibody production hybridoma. Complete The emulsion was prepared by the adjuvant (YATORON) and hypodermically [ of a BALB/c mouse ] was injected with this. This was performed 4 times every two weeks, HSA50microg was melted to the physiological saline after two more weeks, and a medicine was prescribed for the patient into the abdominal cavity. The spleen cell of this mouse was extracted three days after, and cell fusion was carried out to the mouse myeloma cell (P3x63Ag8 and U1 :P 3U1.) using the polyethylene-glycol method. This syncytium was investigated after selection using HSA which carried out anti-HSA antibody activity of a culture supernatant 125I indicators by the HAT medium, cloning was performed further, and the anti-HSA monoclonal antibody production hybridoma (HSAF6H1C11, HSAF6H33C11) was established.

[0025] The anti-HSA monoclonal antibody production hybridoma was prescribed for the patient into 2, 6, 10, and the abdominal cavity of the mouse which carried out 14-tetramethyl pentadecane (pristane: Aldrich) processing, and antibody content ascites was produced.

[0026] The subclass of the produced monoclonal antibody was IgG1.

It is FUIROINDO about biotin (VECTER Lab.) 100microg combined with the rabbit IgG as production carrea protein of the monoclonal antibody to example 2 biotin. Complete

The emulsion was prepared by the adjuvant (YATORON) and hypodermically [ of a BALB/c mouse ] was medicated with this. This was performed twice every two weeks, biotin 100microg combined with Rabbit IgG after two more weeks was melted to the physiological saline, and a medicine was prescribed for the patient into the abdominal cavity. The spleen cell of this mouse was extracted three days after, and cell fusion was performed using the mouse myeloma cell (P3U1) and the polyethylene-glycol method. It is horseradish about the antibiotin antibody activity of after selection and a culture supernatant at a HAT medium in this syncytium. Peroxy dace was investigated using the biotin [biotin-HRPO] (VECTER Lab.) which carried out the indicator, cloning was performed further, and the antibiotin monoclonal antibody production hybridoma was established.

[0027] Monoclonal antibody BRIF2H15C23 secreted from these hybridomas was chosen. The subclass of this monoclonal antibody was IgG1.

[0028] Anti-HSA and the monoclonal antibody production hybridoma of the HGPRT deficit-ized logarithmic growth phase of the (Production a) anti-HSA and the monoclonal antibody production cell of an example 3 salvage-pathway enzyme defect hybridoma (HSAF6H1C11, HSAF6H33C11) were cultivated for 3 hours by the culture medium which contains MNNG (N-methyl-N'-nit low N-nitrosoguanidine) ml 1microg /, and mutagen processing was performed. After mutagen processing, after proliferating a cell by the usual culture medium for two days, it cultivated by the culture medium which added 8-azaguanine ml 20microg /. The cell (cell which salvage pathway is not committing) which cultivated in underground a part of cell (8-azaguanine resistant cell) which can be increased by this 8-azaguanine addition culture medium HAT time, and was not increased was chosen. The cell which furthermore has antibody activity to HSA by the ELISA method was chosen, and cell fusion was performed for this cell and a HGPRT deficit mouse myeloma cell (P3U1) by the polyethylene-glycol method. The cell (HSAF6H1G, HSAF6H33J) which cannot be increased in a HAT medium among this syncytium was chosen. Since growth did not become possible in a HAT medium even if it made it unite with 3UP1 cell a 8-azaguanine resistant cell stock cannot increase in a HAT medium, it was checked that this 8-azaguanine resistant cell is a HGPRT deficit cell.

[0029] (b) the antibiotin monoclonal antibody production hybridoma (BRIF2H15C23) of TK deficit-ized logarithmic growth phase of an antibiotin monoclonal antibody production cell -- MNNG1microg/ml -- it cultivated by the included culture medium for 3 hours, and mutagen processing was performed. After mutagen processing, after proliferating a cell by the usual culture medium for two days, 5-BUROMO-2'-deoxyuridine (BudR: sigma B-5002) was cultivated by the culture medium added ml 30microg /. The cell (cell which salvage pathway is not committing) which cultivated a part of cell (BudR resistant cell) which can be increased by this BudR addition culture medium in the HAT medium, and was not increased was chosen. the cell which is furthermore antibody activity to a biotin by the ELISA method -- choosing -- this and 3UP1 cell -- PEG -- cell fusion was carried out by law and the cell (BRIF2H15B1) which can be increased by the HAT medium was chosen. If a BudR resistant cell is TK deficit cell, the syncytium with 3UP1 cell which is a HGPRT deficit cell will compensate each other deficit enzyme, and growth of it will be attained in a HAT medium. As for the obtained syncytium, growth was checked in the HAT medium, and it was checked that this BudR resistant cell is TK deficit cell.



hybridoma HSAF6H1G (HGPRT-) produced in the production example 3 (a) of example 4 bispecific antibody (TBHF1), and hybridoma BRIF2H15B1 (TK-) which were produced in the example 3 (b) — cell fusion was performed for  $1.1 \times 10^7$  cell by the polyethylene-glycol method, respectively. The syncytium which cultivated in the HAT medium and carried out cell proliferation was selected after fusion, and the antibody activity to HSA and the biotin of a culture supernatant of this syncytium was investigated using the ELISA method. Next, this antibody was made to react to the ELISA plate which solid-phase-ized HSA, and biotin-HRPO was made to react to this. The HRPO activity on solid phase was measured using o-phenylenediamine and  $H_2O_2$ . Cloning of syncytium with bispecific antibody activity is performed after antibody activity measurement, and it is a hybrid. The hybridoma (table 1) was established.

[0030] This hybrid A medicine was prescribed for the patient into the abdominal cavity of the BALB/c mouse which carried out pristane processing of the hybridoma, and antibody content ascites was produced. IgG1 this antinode underwater concentration was 2.4–13mg/ml.

[0031]

[A table 1]

表 1 TBHF1 確立細胞による腹水作製結果

確立細胞	腹水採取量 (ml / mouse)	腹水中の IgG <sub>1</sub> 濃度 (mg / ml)
T B H F 1 H 8	8 . 3	4 . 0
T B H F 1 H 1 4	4 . 5	7 . 2
T B H F 1 H 2 1	7 . 5	2 . 4
T B H F 1 H 2 2	3 . 6	5 . 6
T B H F 1 H 2 5	7 . 7	7 . 8
T B H F 1 H 4 9	6 . 5	6 . 8
T B H F 1 H 5 0	7 . 5	1 0
T B H F 1 H 5 1	6 . 0	5 . 0
T B H F 1 H 5 8	5 . 0	3 . 9
T B H F 1 H 5 9	8 . 5	1 3

(腹水中の IgG<sub>1</sub> 濃度の測定には、TAGO社製「TAGO DIFFUGEN」を使用)

production HSAF6H33J (HGPRT-) of example 5 bispecific antibody (TBHF2), and BRIF2H15B1 (TK-) — cell fusion was performed for  $3.2 \times 10^5$  cells by the polyethylene-glycol method like production of the bispecific antibody (TBHF1) of an example 4, respectively. Bispecific antibody activity is measured for this syncytium after selection by the HAT medium, cloning is performed further, and it is a hybrid. The hybridoma (table 2) was established.

[0032] This hybrid A medicine was prescribed for the patient into the abdominal cavity

of the BALB/c mouse which carried out pristane processing of the hybridoma, and antibody content ascites was produced. IgG1 this antinode underwater concentration was 1.6-11mg/ml.

[0033]

[A table 2]

表 2 T B H F 2 確立細胞による腹水作製結果

確立細胞	腹水採取量 (ml / mouse)	腹水中の I g G , 濃度 (mg / ml)
T B H F 2 H 2	5 . 7	1 . 6
T B H F 2 H 3	4 . 0	4 . 5
T B H F 2 H 5	1 2	2 . 5
T B H F 2 H 6	5 . 7	8 . 2
T B H F 2 H 7	2 . 0	1 1
T B H F 2 H 1 0	2 . 9	4 . 5

(腹水中の I g G , 濃度の測定には、TAGO社製「TAGO DIFFUGEN」を使用)

HSA sandwich technique EIA using example 6 bispecific antibody -- anti- -- HSA diluted solution (1000, 300, 100, 30, 10 ng/ml) 100microl and 200micro [ of 50mM phosphate buffer solutions ] I were made to react to the bead which solid-phase-ized HSA. monoclonal antibody HSAF6H1 (2microg/bead) at a room temperature for 3 hours After purified water washed this twice, bispecific antibody TBHF2H6 ascites diluted solution 100microl and 200micro [ of 50mM phosphate buffer solutions ] I were made to react at 4 degrees C overnight. 300micro (1x10<sup>6</sup>) of biotin-HRPO diluted solution I was made to react at a room temperature further after 2 times washing with purified water for 3 hours. The bead was moved to the test tube for a reaction after 2 times washing with purified water, 300micro (o-phenylenediamine, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) of substrate solutions I was added, the reaction was stopped by 1000micro of 1-N sulfuric acids I after incubation for 15 minutes at the room temperature, and the absorbance in 490nm of a reaction solution was measured. Thus, the obtained result was shown in drawing 1 .

[0034] 3519 shares of CEA which is HGPRT deficit-ized anti-CEA and the monoclonal antibody production hybridoma of example 7 anti-CEA and a monoclonal antibody production cell was processed like the example 3 (a), and the hypoxanthine-guanine-phosphoribosyl-transferase (HGPRT) deficit stock was produced. Using 3519 shares of CEA, it is 8-azaguanine resistance and 20 sorts of HAT susceptibility cells were obtained.

[0035] One A two shares in the HAT susceptibility cell produced according to the example 7 from 3519 shares of production CEA of an example 8 anti-CEA bispecific antibody and TK deficit stock BRIF2H15B1 cell produced in the example 3 (b) were processed like an example 4 or 5. Using every 2.8x10<sup>6</sup> pieces, each cell was united by 1:1 and scattered in 400 wells. Consequently, growth of a cell was accepted into 18 wells. What has the antibody activity over both CEA and a biotin by HAT screening was sorted out, two further screening processings were performed, and each clone of four

sorts of clones, H3, H4, and H5, and H6, was established (what was obtained here was called TBCF1 cell.), among those the clone of H3, H4, and H5 carried out mouse antinode hydration processing. [ i.e., ] This actuation was also performed according to examples 4 and 5.

[0036] It was with TBCF1H3 antibody (200microg [/ml ] antibody concentration according to SRID with the diluent of mouse ascites) obtained from TBCF1H3 clone obtained in the example 9 example 8, and sandwich technique EIA of CEA was performed.

[0037] One bead which solid-phase-sized CEA4230 antibody is put in into the liquid which consists of CEA solution 100microl and buffer-solution 200microl of 0, 4, 10, 40,200, and a 500 ng(s)/ml dilution train, and it was made to react, agitating at a room temperature for 3 hours. Backward above-mentioned TBCF1H3 antibody (200microg/(ml)) 100microl and 200micro of buffer solutions I washed 3 times with purified water were added. You made it react at 4 degrees C for 15 hours, and purified water washed 3 times.

[0038] Next, the biotin-HRPO solution was 300microl Added, and after making it react, agitating at a room temperature for 3 hours, purified water washed 3 times. The bead was moved to the test tube for a reaction, after adding 300micro of substrate solutions I containing o-phenylenediamine, it was made to react for 30 minutes at a room temperature, 1000micro of 1-N sulfuric acids I was added, the reaction was stopped, and the absorbance in 492nm was measured. In addition, the buffer solution used here was a 50mM phosphate buffer solution (1% BSA, pH7.4).

[0039] The standard curve of CEA obtained here was shown in drawing 2 .

[0040]

[Effect of the Invention] The bispecific antibody in this invention by combining with an enzyme, a fluorescent material, etc. which were biotin-ized Since it can be used as tray SATO, without it being possible to use it instead of the labelled antibody which combined the enzyme and the fluorescent material by the conventional chemical technique, and processing an antibody molecule chemically It has further the advantage of being able to use for improvement in manufacture effectiveness, the increment in stability, and the system of measurement of an antigen which is different in a biotin-ized enzyme etc. as a common reagent.

---

[Translation done.]

**\* NOTICES \***

JPO and NCIP I are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

- 1.This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
- 2.\*\*\* shows the word which can not be translated.
- 3.In the drawings, any words are not translated.

---

**DESCRIPTION OF DRAWINGS**

---

[Brief Description of the Drawings]

[Drawing 1] Hybrid of this invention The standard curve of sandwich technique EIA of HSA created using the monoclonal antibody which a hybridoma secretes is shown.

[Drawing 2] The standard curve of sandwich technique EIA of CEA obtained in the example 9 is shown.

---

[Translation done.]

(19)日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11)特許出願公開番号

特開平5-184383

(43)公開日 平成5年(1993)7月27日

(51)Int.Cl. <sup>4</sup>	識別記号	庁内整理番号	FI	技術表示箇所
C12P 21/08		8214-4B		
// C12N 5/18				
15/06		8931-4B	C12N 15/00	C
		7236-4B	5/00	B
審査請求 未請求 請求項の数6(全7頁) 最終頁に続く				

(21)出願番号 特願平3-240139

(22)出願日 平成3年(1991)6月17日

(31)優先権主張番号 特願平2-158817

(32)優先日 平2(1990)6月19日

(33)優先権主張国 日本(JP)

(71)出願人 000109015

ダイナボット株式会社

東京都港区虎ノ門3-8-21 第33森ビル

(72)発明者 倉田 邦夫

千葉県松戸市常盤平双葉町9-1

(72)発明者 熊谷 保之

千葉県松戸市常盤平3-4-7 高野マンション407号

(72)発明者 藤田 顕樹

千葉県松戸市日暮252 金子マンション202号

(72)発明者 早川 進

千葉県松戸市五香六実7-377

(74)代理人 弁理士 斉藤 武彦 (外2名)

(54)【発明の名称】 二重特異性抗体

(57)【要約】

【目的】 抗体を化学的に処理することなく標識剤あるいは細胞毒活性剤による標識が可能で、自由に標識剤等を変更できる、二重特異性を有するモノクローナル抗体を提供する。

【構成】 二つの異なる抗原に対して特異性を有する抗体であって、該抗原の一方がビオチンまたはビオチン誘導体であり、他方が該第一の抗原と異なる抗原である二重特異性抗体は、ビオチンまたはビオチン誘導体に対して特異性を有する抗ビオチン・モノクローナル抗体産生細胞と、ビオチンまたはビオチン誘導体以外の抗原に対して特異性を有するモノクローナル抗体産生細胞との細胞融合により得られる融合細胞により得られる。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 二つの異なる抗原に対して特異性を有する抗体であって、該抗原の一方がビオチンまたはビオチン誘導体であり、他方が該第一の抗原と異なる抗原であることを特徴とする二重特異性抗体。

【請求項2】 ビオチンまたはビオチン誘導体に対して特異性を有する抗ビオチン・モノクローナル抗体産生細胞と、ビオチンまたはビオチン誘導体以外の抗原に対して特異性を有するモノクローナル抗体産生細胞との融合細胞により産生されることを特徴とする請求項1に記載の二重特異性抗体。

【請求項3】 該第一の抗原と異なる抗原が、タンパク質、多糖類、核酸及びこれらの結合物である、請求項1または2に記載の二重特異性抗体。

【請求項4】 該第一の抗原と異なる抗原が、ヒト血清アルブミン、癌胎児性抗原、エラスターゼ-1、IgE、インスリン、扁平上皮癌関連抗原(SCC)、TSHである、請求項1または2に記載の二重特異性抗体。

【請求項5】 融合細胞TBHF1H50〔(受託番号)微工研菌寄第11532号〕、TBHF2H6〔(受託番号)微工研菌寄第11531号〕あるいはTBCF1H3〔(受託番号)微工研菌寄第12287号〕が分泌する請求項1または2に記載の二重特異性抗体。

【請求項6】 ビオチン誘導体がビオチン化酵素あるいはビオチン化した蛍光物質である請求項1ないし4のいずれかに記載の二重特異性抗体。

## 【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、二重特異性抗体に関するものであり、更に詳しくは、ビオチンまたはビオチン誘導体及び該ビオチンまたはビオチン誘導体とは異なる抗原に対して特異性を有する二重特異性抗体に関する。

【0002】

【従来の技術】血液や尿などの体液中の微量物質を高感度に測定する方法として、免疫学的測定法が医療分野、特に診断の分野において広く利用されている。特に、1975年、Milsteinらがマウスのミエローマ細胞と脾臓中の抗体産生細胞との細胞融合によるモノクローナル抗体の生産方法を発表して以来、ハイブリドーマ法によるモノクローナル抗体は、その特異性が高いこと、単一の抗体を比較的簡単にかつ大量に供給することが可能であることなどの利点を有するため、非常に注目され、盛んに研究、利用されてきた。

【0003】このモノクローナル抗体をトレーサー抗体として使用する場合には、この抗体分子にラジオアイソトープ、酵素あるいは蛍光物質などを化学的な処理を施して結合させて用いている。しかし、抗体分子にこのような化学的処理を行うと、抗体分子に損傷を与え、抗体の比活性が低下し、また抗体の安定性に影響を及ぼし、

これらがアッセイ系の安定性や感度の低下の原因となっている。

【0004】一方、モノクローナル抗体の特異性が高いことを利用して、抗体分子中に二つの異なる抗原認識性を持たせ、抗体の利用範囲を拡大する方法が研究されており、このような二重特異性抗体の一方の結合親和性が酵素を直接認識するものである抗体についてすでに報告がなされている。しかし、この抗体は直接酵素を認識するものであるために、標識抗体として免疫学的診断の分野において使用する場合には、酵素の種類、つまり標識剤の種類に多様性をもたせることができなかった。

【0005】また、医薬の分野では、抗腫瘍剤を抗体に結合せしめて、腫瘍部位に選択的に薬剤をデリバリーする方法が研究されているが、この場合も抗腫瘍剤である化合物と腫瘍部位を認識する抗体の双方の修飾が必要となるため、抗腫瘍剤化合物や抗体に悪影響を与えてしまい、簡単に多種多様な組み合わせを作り出すことは困難であった。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】以上のことに鑑み、広範囲な標識剤あるいは細胞毒活性剤に適用可能であり、安定性に優れた抗体の提供が要望されていた。

【0007】

【発明の目的】本発明は、抗体を化学的に処理することなく標識剤あるいは細胞毒活性剤による標識が可能であり、さらに、測定系における標識剤を変更したり、癌治療において細胞毒活性剤を変更しても広く適用可能である、二重特異性を有するモノクローナル抗体を提供するものである。

【0008】

【課題を解決するための手段】本発明に係る二重特異性抗体は、ある種の抗原とビオチンまたはビオチン誘導体の両方に特異性を有するモノクローナル抗体である。すなわち、この二重特異性抗体とビオチン化した酵素、蛍光物質あるいは細胞毒活性物質などを組み合わせることによって、抗体分子を化学的に処理することなくトレーサーあるいはターゲッティング剤として利用することを可能とし、抗体の安定性の増加、さらにはビオチン化酵素などを異なる抗原測定系に使用したり、ビオチン化した抗癌剤を使用して各種の抗癌剤をデリバリーすることも可能にしたものである。

【0009】本発明に係る二重特異性抗体は、下記の手順に従って作製することが可能である。

【0010】まず、測定すべき抗原に対するモノクローナル抗体産生ハイブリドーマ、及びビオチンに対するモノクローナル抗体産生ハイブリドーマをそれぞれ通常の方法に従って作製する。次に、これらハイブリドーマにおける核酸合成サルベージ経路のそれぞれ別の酵素を欠損させる。すなわち抗原に対するモノクローナル抗体産生ハイブリドーマはヒポキサンチン グアニン ホス

ホリボシル トランスフェラーゼ (HGPR T) 欠損細胞、ビオチンに対するモノクローナル抗体産生細胞はチミジン キナーゼ (TK) 欠損細胞とする。この2つの異なった酵素欠損細胞をポリエチレングリコール法により融合させた後、HAT培地(正常培地にヒポキサンチン ( $10^{-6}$  M)、アミノプテリン ( $4 \times 10^{-7}$  M) およびチミジン ( $1.6 \times 10^{-5}$  M) を加えた培地)を用いて融合細胞のみを選択する。このようにして得られたハイブリッド ハイブリドーマから、クローニングにより抗原とビオチンとを同時に認識する抗体を産生している細胞株を選択し、得られたモノクローナル抗体産生株をマウス腹腔中に投与し、抗体含有腹水を作製し、この腹水より目的とする抗体を得る。この抗体は抗原に対する結合親和性と、ビオチンに対する結合親和性を持つ二重特異性抗体であり、この抗体をトレーサーとして用いて抗原の測定系を作製する。またこの抗体を腫瘍部位等への細胞毒活性をもつ化合物を運搬するためのターゲットング剤として用いることもできる。上記モノクローナル抗体産生株は、工業技術院微生物工業技術研究所に寄託されており、微工研菌寄第11531号(TB HF2H6)あるいは微工研菌寄第11532号(TB HF1H50)であるハイブリッド ハイブリドーマが産生する抗体は、ビオチン及びヒト血清アルブミンに対して特異性を有する二重特異性抗体で、それを用い、ビオチン-HRPOを標識剤として使用することにより、ヒト血清アルブミンをEIAにより測定することができる。

【0011】さらに、微工研菌寄第12287号(TB CF1H3)であるハイブリッドハイブリドーマが産生する抗体は、ビオチン及び癌胎児性抗原(CEA)に対して特異性を有する二重特異性抗体である。

【0012】該ビオチンあるいはビオチン誘導体とは異なる抗原(第二の抗原)に対するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマとしては、ヒト血清アルブミンに対するモノクローナル抗体産生ハイブリドーマHSAF6H1C11、HSAF6H33C11、癌胎児性抗原に対するモノクローナル抗体産生ハイブリドーマCEAF22H5、CEA3519、エラスターゼ-1に対するモノクローナル抗体産生ハイブリドーマELSF13H4、IgEに対するモノクローナル抗体産生ハイブリドーマIGE3H22、インスリンに対するモノクローナル抗体産生ハイブリドーマINSF9H2、扁平上皮癌関連抗原SCCに対するモノクローナル抗体産生ハイブリドーマSCCF1H3、TSHに対するモノクローナル抗体産生ハイブリドーマTSHF8H4などを挙げることができるが、該第二の抗原に対するモノクローナル抗体産生ハイブリドーマとしては、上記のような処理をして、二重特異性抗体を製造しようとするのであれば、特に限定されずに用いることができる。

【0013】この場合における第二の抗原としては、タ

ンパク質、ポリペプチド、多糖類、核酸及びこれらの化合物などを挙げることができる。このようなもののうちには、燐タンパク質、リボタンパク質、糖タンパク質、ムコタンパク質、細菌、ウイルス、腫瘍細胞、リケッチアあるいはそれらの表面抗原などが挙げられる。

【0014】このような抗原のうち、タンパク質及びポリペプチドとしては、ソマトトロピン、プロラクチン、インスリン、LH-RH、ゴナドトロピンなどのホルモン類、チロキシン結合グロブリン、 $\alpha_1$ -アンチトリブリン、 $\alpha_1$ -酸性糖タンパク質、 $\alpha_2$ -マクログロブリン、アルブミンなどの血漿タンパク質、免疫グロブリンあるいはそれらの断片、補体因子、血液凝固因子、セクレチン、ガストリンなどの組織ホルモン類などが挙げられる。

【0015】この他、癌関連抗原として知られたもの、例えばCEA、AFP、SCC、Span-1、CA19-9、CA125、B72・3抗原(TAG-72)、T抗原などをあげることができる。

【0016】また、細胞表面のリセプターなどもあげられる。

【0017】さらにまた、第二の抗原としては、グラム陽性菌、グラム陰性菌に存在する各種抗原、リケッチア、マイコプラズマあるいは肝炎ウイルス、腫瘍ウイルス、AIDS原因ウイルスなどの各種ウイルス及びその産生抗原が挙げられる。またこれらの抗原のうちには、各種アルカロイド、各種ステロイド、ペニシリン系及びセファロsporin系抗生物質、ゲンタマイシン、カナマイシン、エリスロマイシン等の抗生物質、バルビツール酸系薬物、カテコールアミン、エフェドリン等の薬物、クロルプロマジン、アゼピン類、ビタミン類、プロスタグランジン類をはじめとする各種の薬剤・薬物が挙げられる。これらの抗原は、本発明の目的を達成しうる限り、特に限定せずに選ぶことができ、当該分野の文献などにより知られているものの中から選ぶことができる。

【0018】このようにして得られた二重特異性抗体は、血液などの体液中の抗原を測定するサンドイッチ法や、組織中の抗原を測定する組織染色法など、免疫学的測定系に利用することができる。

【0019】さらにまた抗癌剤やリシン、ジフテリアトキシンといった細胞毒活性を有する化合物をビオチン化し、特にビオチンと癌関連抗原とを認識する二重特異性抗体をそのビオチン化細胞毒活性化合物と反応せしめて抗体-薬物コンジュゲートを形成することができる。こうして得られた抗体-薬物コンジュゲートはその二重特異性抗体の認識する特定の部位、例えば腫瘍細胞への薬物のデリバリーを可能にする。こうして得られた二重特異性抗体を利用すればただ一種の抗体を利用して種々の薬物を運搬することが可能になる。

【0020】サンドイッチ法による抗原の測定は、以下のように行うことができる。

【0021】測定すべき抗原に対する抗体を不溶性担体に結合させて得られた固相化抗体に対して、血清や尿などの検体を反応させた後、未反応液を洗浄除去する。次に、測定抗原及びビオチンに対し結合親和性を有する二重特異性抗体溶液を反応させる。さらに固相を洗浄した後、これに酵素を結合したビオチン溶液を混合し、反応を行う。この反応は、予め二重特異性抗体とビオチン化酵素を混合しておき、この混合溶液を検体を反応させた後の固相と反応させても良い。このビオチン化酵素と反応した固相を洗浄し、基質溶液を加え酵素反応を行わせる。酵素反応を停止させた後、反応溶液の吸光度を測定し、検体の代わりに標準抗原を用いて作成された標準曲線より測定すべき抗原濃度を求めることができる。

【0022】本発明の二重特異性抗体は、一方の抗原認識部位がビオチンを認識するものであり、ビオチンは蛋白質や核酸、その他様々な化学物質と結合することができるため、標識剤として酵素に限定されることなく蛍光物質等、種々の化合物を使用することが可能である他、抗腫瘍剤等の種々の薬物をも用いることができる。さらに、ビオチンはアビジンとのシステムを利用することにより、測定系の感度を上げることも可能である。

【0023】

【実施例】以下、本発明を実施例に基づいて説明する。

【0024】実施例1

抗ヒト血清アルブミン(HSA)抗体産生ハイブリドーマの作製

HSA(Miles Inc.) 50 $\mu$ gをフロインドコンブリート アジュバント(ヤトロン)とでエマルジョンを調製し、これをBALB/cマウスの皮下に注射した。これを2週間ごとに4回行い、さらに2週間後にHSA 50 $\mu$ gを生理食塩水に溶かし腹腔中に投与した。このマウスの脾臓細胞を3日後に摘出し、マウスミエローマ細胞(P3 $\times$ 63Ag8 $\cdot$ U1:P3U1)とポリエチレングリコール法を用いて細胞融合させた。この融合細胞をHAT培地で選択後、培養上清の抗HSA抗体活性を<sup>125</sup>I標識したHSAを用いて調べ、さらにクローニングを行い、抗HSAモノクローナル抗体産生ハイブリドーマ(HSAF6H1C11, HSAF6H33C11)を確立した。

【0025】抗HSAモノクローナル抗体産生ハイブリドーマを2, 6, 10, 14-テトラメチルペンタデカン(プリスタン:アルドリッチ社)処理したマウスの腹腔中に投与し、抗体含有腹水を作製した。

【0026】産生されたモノクローナル抗体のサブクラスは、IgG<sub>1</sub>であった。

実施例2

ビオチンに対するモノクローナル抗体の作製

キャリア蛋白としてのウサギIgGに結合したビオチン(VECTER Lab.) 100 $\mu$ gをフロインドコンブリート アジュバント(ヤトロン)とでエマルジ

ョンを調製し、これをBALB/cマウスの皮下に投与した。これを2週間ごとに2回行い、さらに2週間後にウサギIgGに結合したビオチン100 $\mu$ gを生理食塩水に溶かし腹腔中に投与した。このマウスの脾臓細胞を3日後に摘出し、マウスミエローマ細胞(P3U1)とポリエチレングリコール法を用いて細胞融合を行った。この融合細胞をHAT培地で選択後、培養上清の抗ビオチン抗体活性をホースラディッシュ パーオキシダーゼを標識したビオチン[ビオチン-HRPO](VECTER Lab.)を用いて調べ、さらにクローニングを行い、抗ビオチン・モノクローナル抗体産生ハイブリドーマを確立した。

【0027】これらハイブリドーマから分泌されるモノクローナル抗体BRIF2H15C23を選んだ。このモノクローナル抗体のサブクラスは、IgG<sub>1</sub>であった。

【0028】実施例3

サルベージ経路酵素欠損ハイブリドーマの作製

(a) 抗HSA・モノクローナル抗体産生細胞のHGPR T欠損化

対数増殖期の抗HSA・モノクローナル抗体産生ハイブリドーマ(HSAF6H1C11, HSAF6H33C11)をMNNG(N-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン)を1 $\mu$ g/ml含む培地で3時間培養し、変異原処理を行った。変異原処理後、2日間通常の培地で細胞を増殖させた後、8-アザグアニンを20 $\mu$ g/ml添加した培地で培養を行った。この8-アザグアニン添加培地で増殖可能な細胞(8-アザグアニン耐性細胞)の一部をHAT培地中で培養し増殖しなかった細胞(サルベージ経路が働いていない細胞)を選んだ。さらにELISA法でHSAに対し抗体活性のある細胞を選び、この細胞とHGPR T欠損マウスミエローマ細胞(P3U1)とをポリエチレングリコール法により細胞融合を行った。この融合細胞のうち、HAT培地中で増殖不可能な細胞(HSAF6H1G, HSAF6H33J)を選んだ。8-アザグアニン耐性細胞株がHAT培地中で増殖不可能であることと、P3U1細胞と融合させてもHAT培地中で増殖可能とならないことから、この8-アザグアニン耐性細胞はHGPR T欠損細胞であることが確認された。

【0029】(b) 抗ビオチン・モノクローナル抗体産生細胞のTK欠損化

対数増殖期の抗ビオチン・モノクローナル抗体産生ハイブリドーマ(BRIF2H15C23)をMNNG 1 $\mu$ g/ml含む培地で3時間培養し、変異原処理を行った。変異原処理後、2日間通常の培地で細胞を増殖させた後、5-ブロモ-2'-デオキシウリジン(BudR:シグマ B-5002)を30 $\mu$ g/ml添加した培地で培養した。このBudR添加培地で増殖可能な細胞(BudR耐性細胞)の一部をHAT培地中で培養し



増殖しなかった細胞（サルベージ経路が働いていない細胞）を選んだ。さらにELISA法でビオチンに対し抗体活性である細胞を選び、これとP3U1細胞とをPEG法により細胞融合させ、HAT培地で増殖可能な細胞（BRIF2H15B1）を選んだ。BudR耐性細胞がTK欠損細胞であれば、HGPR T欠損細胞であるP3U1細胞との融合細胞は、お互いの欠損酵素を補ってHAT培地中で増殖可能となる。得られた融合細胞はHAT培地中で増殖が確認され、このBudR耐性細胞がTK欠損細胞であることが確認された。

#### 実施例4

##### 二重特異性抗体（TBHF1）の作製

実施例3（a）で作製したハイブリドーマHSAF6H1G（HGPR T-）と、実施例3（b）で作製したハイブリドーマBRIF2H15B1（TK-）のそれぞれ $1.1 \times 10^7$ 細胞とをポリエチレングリコール法に\*

\*より細胞融合を行った。融合後、HAT培地中で培養し細胞増殖をした融合細胞を選び出し、この融合細胞の培養上清のHSAとビオチンへの抗体活性をELISA法を用いて調べた。次に、この抗体をHSAを固相化したELISAプレートに反応させ、これにビオチン-HRPOを反応させた。固相上のHRPO活性を $\alpha$ -フェニレンジアミンと $H_2O_2$ を用いて測定した。抗体活性測定後、二重特異性抗体活性のある融合細胞のクローニングを行い、ハイブリッド ハイブリドーマ（表1）を確

立した。

【0030】このハイブリッド ハイブリドーマをブリスタン処理したBALB/cマウスの腹腔中に投与し、抗体含有腹水を作製した。この腹水中のIgG<sub>1</sub>濃度は $2.4 \sim 13 \text{ mg/ml}$ であった。

【0031】

【表1】

表1 TBHF1確立細胞による腹水作製結果

確立細胞	腹水採取量 (ml/mouse)	腹水中のIgG <sub>1</sub> 濃度 (mg/ml)
TBHF1H8	8.3	4.0
TBHF1H14	4.5	7.2
TBHF1H21	7.5	2.4
TBHF1H22	3.6	5.6
TBHF1H25	7.7	7.8
TBHF1H49	6.5	6.8
TBHF1H50	7.5	10
TBHF1H51	6.0	5.0
TBHF1H58	5.0	3.9
TBHF1H59	8.5	13

（腹水中のIgG<sub>1</sub>濃度の測定には、TAGO社製「TAGO DIFFUGEN」を使用）

#### 実施例5

##### 二重特異性抗体（TBHF2）の作製

HSAF6H33J（HGPR T-）とBRIF2H15B1（TK-）のそれぞれ $3.2 \times 10^5$ 細胞を実施例4の二重特異性抗体（TBHF1）の作製と同様にポリエチレングリコール法で細胞融合を行った。この融合細胞をHAT培地で選択後、二重特異性抗体活性を測定し、さらにクローニングを行って、ハイブリッド ハイ

ブリドーマ（表2）を確立した。

40 【0032】このハイブリッド ハイブリドーマをブリスタン処理したBALB/cマウスの腹腔中に投与し、抗体含有腹水を作製した。この腹水中のIgG<sub>1</sub>濃度は $1.6 \sim 11 \text{ mg/ml}$ であった。

【0033】

【表2】

表2 TBHF2 確立細胞による腹水作製結果

確立細胞	腹水採取量 (ml/mouse)	腹水中のIgG濃度 (mg/ml)
TBHF2H2	5.7	1.6
TBHF2H3	4.0	4.5
TBHF2H5	1.2	2.5
TBHF2H6	5.7	8.2
TBHF2H7	2.0	1.1
TBHF2H10	2.9	4.5

(腹水中のIgG濃度の測定には、TAGO社製「TAGO DIFFUGEN」を使用)

#### 実施例6

二重特異性抗体を用いたHSAサンドイッチ法EIA  
抗HSA・モノクローナル抗体HSAF6H1を固相化  
(2 $\mu$ g/bead)したビーズに、HSA希釈溶液  
(1000, 300, 100, 30, 10ng/ml)  
100 $\mu$ l及び50mMリン酸緩衝液200 $\mu$ lを室温  
で3時間反応させた。これを精製水で2回洗浄した後、  
二重特異性抗体TBHF2H6腹水希釈溶液100 $\mu$ l  
及び50mMリン酸緩衝液200 $\mu$ lを4 $^{\circ}$ Cで一晩反応  
させた。精製水で2回洗浄後、さらにビオチン-HRP  
O希釈溶液(1 $\times$ 10 $^6$ )300 $\mu$ lを室温で3時間反  
応させた。精製水で2回洗浄後、ビーズを反応用試験管  
に移し、基質溶液(o-フェニレンジアミン、H  
2O2)300 $\mu$ lを加え、室温で15分間インキュベ  
ート後、1N硫酸1000 $\mu$ lで反応を停止させ、反応  
溶液の490nmにおける吸光度を測定した。このよう  
にして得られた結果を図1に示した。

#### 【0034】実施例7

抗CEA・モノクローナル抗体産生細胞のHGPR T欠  
損化

抗CEA・モノクローナル抗体産生ハイブリドーマであ  
るCEA3519株を実施例3(a)と同様に処理し  
て、ヒポキサンチン・グアニン・ホスホリボシルトラン  
スフェラーゼ(HGPR T)欠損株を作製した。CEA  
3519株を使用して8-アザグアニン耐性で且つHA  
T感受性細胞を20種得た。

#### 【0035】実施例8

抗CEA二重特異性抗体の作製

CEA3519株から実施例7に従って作製されたHA  
T感受性細胞のうちの一つA2株と実施例3(b)で作  
製されたTK欠損株BR1F2H15B1細胞とを、実  
施例4あるいは5と同様にして処理した。各細胞は2.  
8 $\times$ 10 $^6$ 個づつを用い、1:1で融合し、400個の  
ウェル中に播いた。その結果、18個のウェル中に細胞

の増殖が認められた。HATスクリーニングでCEAと  
ビオチンとの両方に対する抗体活性を持つものを、選別  
し、2回のさらなるスクリーニング処理を施して、4種  
のクローン即ちH3, H4, H5, H6, の各クロー  
ンを確立(ここで得られたものをTBCF1細胞と称し  
た。)し、そのうちH3, H4及びH5のクローンはマ  
ウス腹水処理した。この操作も実施例4及び5に準じ  
て行った。

#### 【0036】実施例9

実施例8で得られたTBCF1H3クローンから得られ  
たTBCF1H3抗体(マウス腹水の希釈液で、SR I  
Dによる抗体濃度200 $\mu$ g/ml)をもちいてCEA  
のサンドイッチ法EIAを行った。

【0037】CEA4230抗体を固相化したビーズ1  
個を0, 4, 10, 40, 200及び500ng/ml  
の希釈列のCEA溶液100 $\mu$ l及び緩衝液200 $\mu$ l  
とからなる液に入れ、室温で3時間攪拌しながら反応  
させた。精製水で3回洗浄した後上記TBCF1H3抗  
体(200 $\mu$ g/ml)100 $\mu$ l及び緩衝液200 $\mu$   
lを加えた。4 $^{\circ}$ Cで15時間反応せしめ、精製水で3回  
洗浄した。

【0038】次にビオチン-HRP O溶液を300 $\mu$ l  
加え、室温で3時間攪拌しながら反応させた後、3回精  
製水で洗浄した。ビーズを反応用試験管に移し、o-フ  
ェニレンジアミンを含有する基質溶液300 $\mu$ lを加え  
た後、室温で30分間反応させ、1N硫酸1000 $\mu$ l  
を加え反応を停止させ、492nmにおける吸光度を測  
定した。なお、ここで用いられた緩衝液は50mMリン  
酸緩衝液(1%BSA, pH7.4)であった。

【0039】ここでえられたCEAの標準曲線を図2に  
示した。

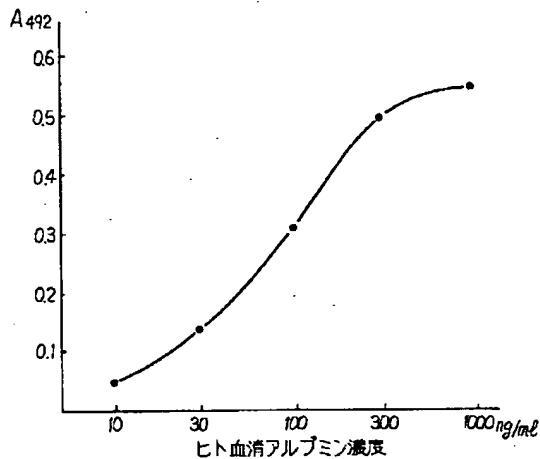
#### 【0040】

【発明の効果】本発明における二重特異性抗体は、ビオ  
チン化した酵素や蛍光物質などと組み合わせることによ

って、従来の化学的手法により酵素や蛍光物質を結合させた標識抗体の代わりに使用することが可能であって、抗体分子を化学的に処理することなくトレーサートとして使用することができるので、製造効率の向上、安定性の増加、さらにはビオチン化酵素などを異なる抗原の測定系に共通試薬として用いることができるなどの利点を有する。

\*

【図1】

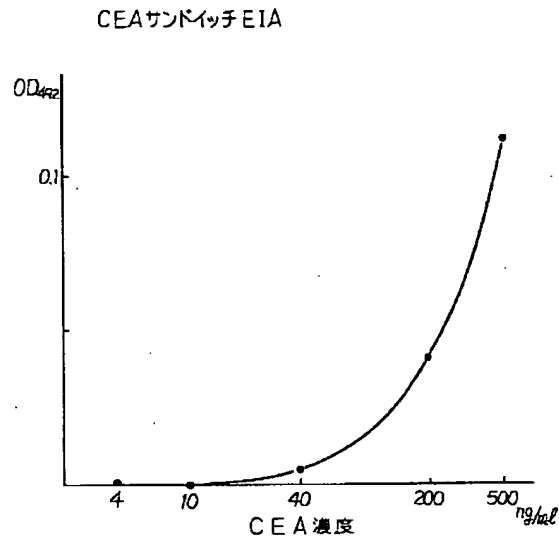


\*【図面の簡単な説明】

【図1】本発明のハイブリッド ハイブリドーマが分泌するモノクローナル抗体を使用して作成されたHSAのサンドイッチ法EIAの標準曲線を示したものである。

【図2】実施例9で得られたCEAのサンドイッチ法EIAの標準曲線を示す。

【図2】



フロントページの続き

(51)Int.Cl.<sup>3</sup>

G 0 1 N 33/53  
33/531  
33/574  
33/577

(C 1 2 P 21/08  
C 1 2 R 1:91)

識別記号	庁内整理番号
U	8310-2J
A	8310-2J
E	9015-2J
B	9015-2J

F I

技術表示箇所